

灯盏花乙素在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究*

荣娜娜¹, 张伟[△], 杨兆祥²

(1. 昆明医学院, 云南昆明 650031; 2. 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南昆明 650100)

【摘要】目的: 以《中国药典》现行版中的人工胃液和人工肠液模拟人体胃肠环境, 对灯盏花乙素在其中的稳定性进行研究。方法: 将灯盏花乙素放入模拟人工胃液和人工肠液条件, HPLC 和 LC—MS 鉴定结果。结果: 灯盏花乙素在人工胃液中从 0.5~2.5h 出现降解产物, 经 LC—MS 鉴定降解产物为灯盏花乙素苷元, 而灯盏花乙素在人工肠液中没有出现降解产物。结论: 灯盏花乙素在人工胃液中不稳定而在人工肠液中较为稳定。

【关键词】灯盏花乙素; 人工胃液; 人工肠液; 灯盏花乙素苷元

中图分类号: R285.6 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2011)05—0030—04

灯盏花乙素 (scutellarin) 占灯盏花素 (breviscapine) 含量的 90% 以上, 是从菊科植物灯盏细辛 (*Erigeron breviscapu*) 中提取的黄酮类有效成分, 结构式为 4, 5, 6—三羟基黄酮—7—葡萄糖醛酸苷, 又名野黄芩苷 (图 1)。灯盏花乙素临床上广泛应用于心脑血管疾病, 具有改善脑血循环, 增加脑血流量, 降低血管阻力和抗血小板凝聚等作用。大量的临床报道证明, 灯盏花 (素) 注射剂治疗心脑血管疾病疗效确切, 但口服制剂的生物利用度极低始终是未能解决的瓶颈问题, 研究^[1-2]表明, 在静脉注射灯盏花素后灯盏花乙素在体内符合三室动力学模型, 口服生物利用度低。葛庆华等^[3]研究发现 beagle 犬口服灯盏花乙素原料药后其绝对生物利用度仅为 $(0.40 \pm 0.19)\%$, 人口服灯盏花素片后血浆中未检测到灯盏花乙素, 提示灯盏花乙素可能在胃肠道及体循环中发生了严重降解与代谢。本文通过对灯盏花乙素在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究来探讨口服后的灯盏花乙素是否能被人体有效的吸收。该问题包括两个方面: 灯盏花乙素在人体胃肠道中是否会被破坏? 如果出现破坏, 是否出现降解产物, 其降解产物又是什么?

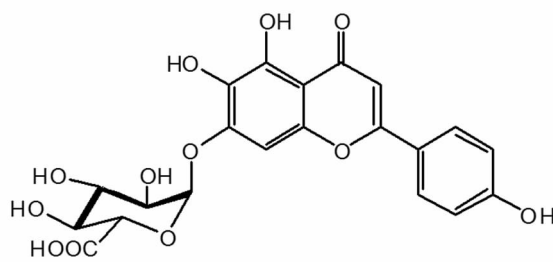


图 1 灯盏花乙素结构式

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括 G1322A 真空脱气机, G1311A 四元梯度泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 二极管阵列检测器, Chemstation 化学工作站; Sartorius BP221s 型电子天平; pH S-25 型 PH 计 (上海雷磁仪器厂); 灯盏花乙素 (云南植物药业有限公司, 批号: H20090703); 野黄芩苷 (灯盏花乙素) 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 20080816); 胃蛋白酶 (Sigma 公司); 胰蛋白酶 (Sigma 公司); 甲醇 (色谱纯); 四氢呋喃 (色谱纯), 其它试剂为 AR 试剂。

2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm); 流动相: 灯盏花乙素: 甲醇—四氢呋喃—水 (23:10:67); 检测波长: 灯盏花乙素 335nm 流

* 收稿日期: 2011—02—12 修回日期: 2011—04—27

作者简介: 荣娜娜 (1984~), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 研究方向: 药物化学。△通讯作者: 张伟, E-mail: wzhangkm@sohu.com.

速: 1.0mL/min; 进样量: 10μL; 柱温: 25℃。

3 人工胃液和人工肠液

人工胃液: 按《中国药典》2010 版附录配制。空白人工胃液: 除不含胃蛋白酶外, 其余配方与人工胃液相同。人工肠液: 按《中国药典》2010 版附录配制。空白人工肠液: 除不含胰蛋白酶外, 其余配方与人工肠液相同。

4 人工胃液对灯盏花乙素稳定性的影响

分别取灯盏花乙素 20mg 各自加入到 100mL 人工胃液和空白人工胃液中, 37℃ 保温, 每 0.5h 取样, 经 0.45μm 微孔滤膜过滤后, 注入高效液相检测, 并与 0h 人工胃液和同时时间的空白人工胃液的色谱图进行比较。见 (图 2 - 图 4)

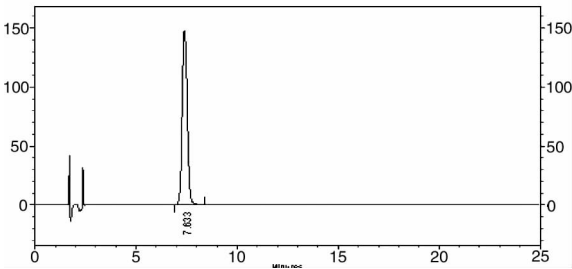


图 2 灯盏花乙素在人工胃液中 0h 色谱图

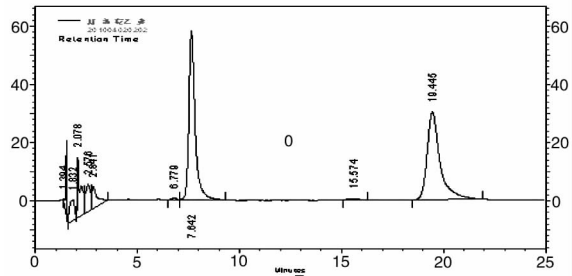


图 3 灯盏花乙素在人工胃液中 1h 色谱图

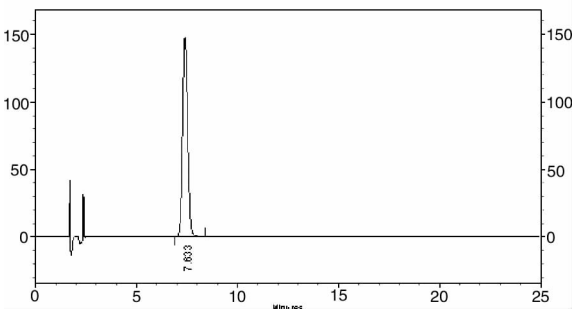


图 4 灯盏花乙素在空白人工胃液中 1h 色谱图

5 人工肠液对灯盏花乙素稳定性的影响

分别取灯盏花乙素 20mg 各自加入到 100mL 人

工肠液和人工肠液 NE 中, 37℃ 保温, 每 0.5h 取样, 经 0.45μm 微孔滤膜过滤后, 注入高效液相检测, 并与 0h 人工肠液和同时时间的空白人工肠液的色谱图进行比较。(见图 5 - 图 6)

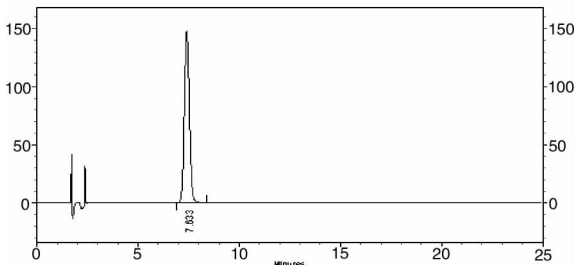


图 5 灯盏花乙素在人工肠液中 1.5h 色谱图

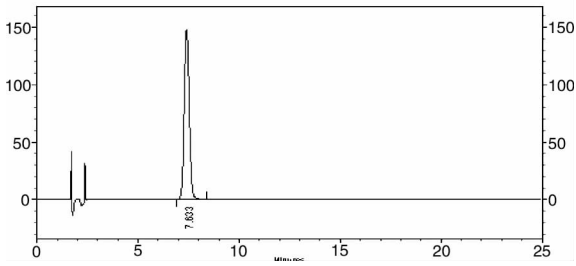


图 6 灯盏花乙素在空白人工肠液中 1.5h 色谱图

6 结果

通过以上实验, 发现灯盏花乙素在人工胃液中不稳定, 从 0.5h 到 2.5h 之间出现降解产物, 且 1h 时, 出现降解产物的量最大 (见表 1)。灯盏花乙素在空白人工胃液中, 没有出现任何变化。灯盏花乙素人工肠液中较为稳定, 直到 4h 都没发生变化。

表 1 灯盏花乙素在人工胃液中时间与峰面积变化图

取样时间 /h	灯盏花乙素峰面积 及保留时间/min	降解产物峰面积 及保留时间/min
0	31590, 7.6	0, 0
0.5	31400, 7.6	57.3, 19.4
1	12328, 7.6	13325, 19.4
1.5	14596, 7.6	11362, 19.4
2	17281, 7.6	847, 19.4
2.5	23170, 7.6	11, 19.4
3	22986, 7.6	0, 0

通过灯盏花乙素光谱图和降解产物的光谱图，可以看出降解产物和灯盏花乙素一样都属于黄酮类物质。(图 7－图 8)

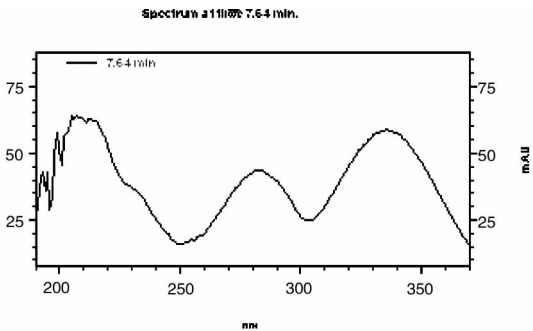


图 7 灯盏花乙素光谱图

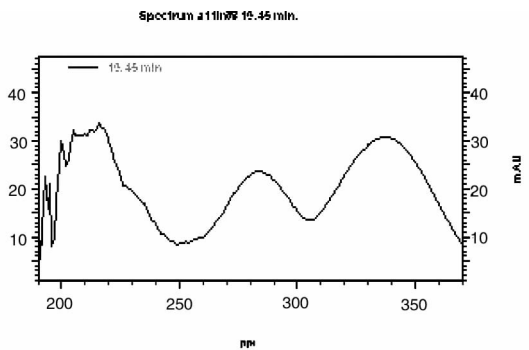


图 8 降解产物光谱图

6.1 降解产物的鉴定

6.1.1 仪器及色谱条件 Waters 液相色谱

质谱联用仪 (Ultraperformance LC, Quattra Premier 质谱仪); Driect - Q5 超纯水机 (Millipore), SartorisBP211D 型电子天平。液相条件: Acquity UPLC BE. C₁₈ 色谱柱 (2.1mm × 50mm, 1.7μm); 流动相: A (甲醇), B (5mmol · L 甲酸铵, 0.1% 甲酸); 梯度: 0 ~ 5min. A: 5% ~ 25%; B: 95% ~ 75%; 流量: 0.4mL · min⁻¹; 分流后进入质谱; 柱温: 40℃。质谱条件: ESI⁻; 多反应检测 (MRM); 毛细管电压: 2.5kv; 锥孔电压: 50v; 离子源温度: 120℃; 氮气流量: 400L · h⁻¹。

取灯盏花乙素在人工胃液 37℃ 保温培养 1h 的溶液, 经 0.25μm 微孔滤膜过滤注入液质联用仪。结果见 (图 9－图 11)

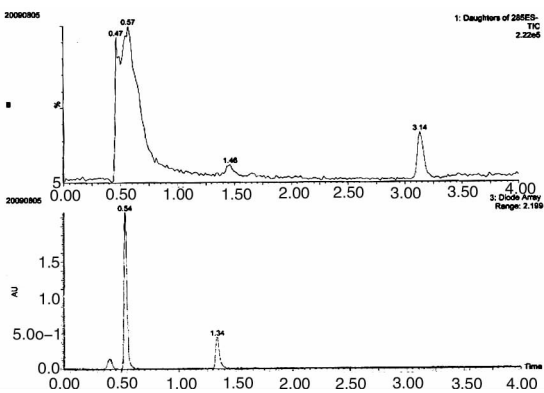


图 9 灯盏花乙素在人工胃液 37℃ 保温培养 1h 液质

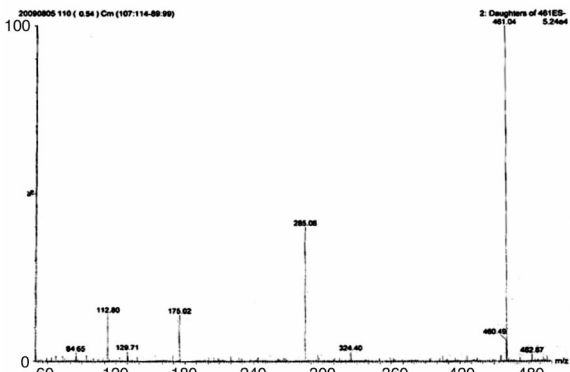


图 10 液相为 0.54min 时间的质谱图

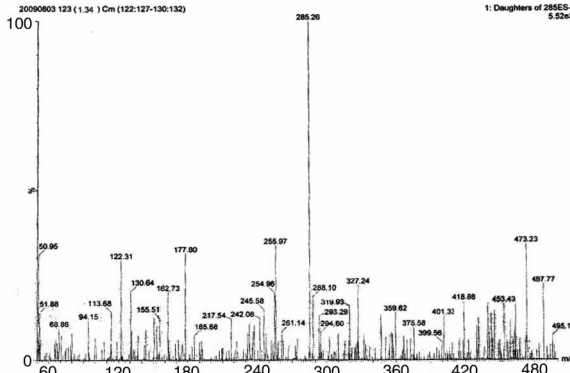


图 11 液相为 1.34min 的质谱图

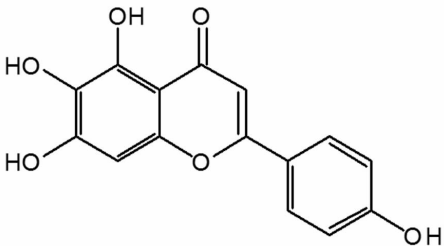


图 12 灯盏花乙素苷元结构式

通过 LC-MS 分析, 我们可以看到降解产物为灯盏花乙素苷元, 与其光谱图吻合, 属于黄酮类物质。其结构式见图 12。

7 讨论

本研究发现灯盏花乙素在人工胃液中不稳定, 胃蛋白酶能使灯盏花乙素降解, 从 0.5h 开始出现降解产物为灯盏花乙素苷元, 直到 2.5h 之后消失, 且 1h 时, 出现降解产物的量最大。可见胃蛋白酶对灯盏花乙素的降解作用是有持续性的, 在 2h 左右, 这和正常胃消化食物作用相似。而且胃蛋白酶的作用时间还具有峰值, 在 1h, 这个时候能使灯盏花乙素降解量达到最大。而人工肠液对灯盏花乙素的影响很小, 有研究发现, 灯盏花乙素在肠道内可被肠道菌群水解为苷元^[4], 通过本研究可见在肠道内, 肠液本身对灯盏花乙素影响不大, 而在胃液中的胃蛋白酶是降解灯盏花乙素的主要物质。

Hao X H^[5]等对大鼠灌胃和静注给药, 研究的灯盏花乙素在肝脏的代谢对口服生物利用度的影响, 发现灯盏花乙素吸收过程中, 首过效应的主要部位不是肝脏而是胃肠道。本实验模拟人工胃肠液环境, 发现在人工胃液中, 灯盏花乙素可被胃蛋白酶降解为灯盏花乙素苷元, 可见胃液对灯盏花乙素的首过效应明显。同时灯盏花乙素水溶性差, 在乙醚等有机溶剂中溶解度也差, 难以被吸收, 而其苷元分子量较小, 脂溶性较好, 易被吸收, 在人体吸收入血前, 在胃内灯盏花乙素和灯盏花乙素苷元并存。有研究报道^[6], 灯盏花乙素在大鼠胆汁中的代谢产物研究, 发现中间产物灯盏花乙素苷元是灯盏花乙素吸收的主要形式。可见, 灯盏花乙素苷元

更易于吸收。车庆明等^[7]对大鼠灌胃给药灯盏花乙素苷元后发现, 灯盏花乙素苷元被吸收后, 在体内发生葡萄糖醛酸化, 转化为灯盏花乙素。由于胃液对灯盏花乙素的降解, 而产生的灯盏花乙素苷元的量很小, 吸收进入体的量很低, 从而吸收进入体后转化为灯盏花乙素的量也很少, 这也是灯盏花乙素口服生物利用度低的原因之一。由此可见, 避免胃液对灯盏花乙素的首过效应是改变灯盏花口服制剂应考虑方面。

[参考文献]

- [1] 李素华, 蒋学华, 兰轲, 等. 灯盏花素在家犬体内的药动学研究 [J]. J Chin Pharm Sci, 2003, 12 (3): 127.
- [2] 刘奕明, 林爱华, 陈汇, 等. 灯盏乙素在家兔体内药代动力学 [J]. 药学报, 2003, 38 (10): 775.
- [3] 葛庆华, 周臻, 支晓瑾, 等. 灯盏花素在犬体内的药动学和绝对生物利用度研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34 (12): 618-620.
- [4] 居文政, 储继红, 谭仁祥, 等. UPLC-MS/MS 联用法分析灯盏花乙素在胃肠道的代谢物 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11 (3): 292.
- [5] Hao X H, Cheng G, Yu J, et al. Study on the role of hepatic first-pass elimination in the low oral bioavailability of scutellarin in rats [J]. Pharm, 2005, 60 (6): 477.
- [6] ZHANG J L, CHE Q M, L I S Z I Study on metabolism of scutellarin in rats by HPLC2MS and HPLC2NMR [J]. J Natural Products Res, 2003, 5 (4): 2492-2561.
- [7] 车庆明, 潘丽怡, 陈颖, 何红, 等. 灯盏花乙素苷元的药动学研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 9 (43): 18.

(编辑: 岳胜难)

Study the Stability of Scutellarin on Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid

RONG Na-na, ZHANG Wei, YANG Zhao-xiang

(1. Kunming college of Medicine, Kunming Yunnan 650031;

2. Institute for Drug Research and Development of Kunming Yunnan, 650100 China)

[ABSTRACT] Objective: We used the methods in CHP to analog the stomach and intestine environment to study the stability of scutellarin in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. Methods: Put scutellarin into artificial stomach and intestines of the artificial, With HPLC and LC-MS results. Results: Scutellarin appearing degradation products which has been identified to be scutellarein in 0.5h~2.5h. But in simulated intestinal liquid don't have an object becomes degradation. Conclusions: Scutellarin was not stable in simulated gastric liquid, but it was stable in simulated intestinal liquid.

[KEY WORDS] scutellarin; scutrellarein; simulated intestinal liquid; simulated gastric liquid